

УДК 577.218

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ДОМЕНОВ VAR170 В ЭНХАНСЕР-ЗАВИСИМОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2025 г. В. К. Чмыхало^{1, *}, D. Amendola², Ю. В. Шидловский¹, Л.А. Лебедева¹,
иностраннный член РАН Р. Schedl³, E. Giordano²

Поступило 30.10.2024 г.

После доработки 21.11.2024 г.

Принято к публикации 22.11.2024 г.

Субъединица Var170 ремоделера хроматина SWI/SNF демонстрирует функции активатора при ее искусственном привлечении на промотор репортера *LacZ* в энхансер-зависимой транскрипции. В данной работе проведен анализ функциональной значимости доменов белка Var170 в активации репортера. Делеция ДНК-связывающего домена ARID не снижает активности Var170. При привлечении формы Var170 без области, включающей мотивы LXXLL, наблюдалось повышение экспрессии репортера *LacZ*. Делеции центральной (домен RFX и IDRs) и С-концевой области (цинковые пальцы) Var170 приводят к существенному снижению экспрессии трансгена. По-видимому, данные области критически важны для функционирования этого белка в энхансер-зависимой транскрипции.

Ключевые слова: комплексы SWI/SNF, PBAP, Var170, домен ARID, энхансер, LexA

DOI: 10.31857/S2686738925010276, **EDN:** svxapo

Регуляция транскрипции генов у эукариот крайне сложна и реализуется посредством большого числа механизмов, одним из которых является ремоделирование матрицы хроматина. Этот процесс осуществляется АТФ-зависимыми ремоделерами хроматина, которые представлены консервативными мультисубъединичными белковыми комплексами, таким как CHD/Mi-2, INO80, ISWI и SWI/SNF [1]. Семейство SWI/SNF уникально своей ролью в регуляции транскрипции тканеспецифичных и индуцибельных генов. У насекомых семейство SWI/SNF представлено тремя подсемействами – BAP, Polybromo-содержащий BAP (PBAP) и неканонический BAP (ncBAP, или глиома-специфичный BAP – GBAP), которые являются ортологами подсемейств BAF, PBAF и GBAF млекопитающих [2, 3]. Считается, что различные подсемейства SWI/SNF вовлечены в транскрипцию мишеней различных сигнальных путей [4–7].

Различия в субъединичном составе подсемейств SWI/SNF – давно установленный факт, однако функциональная значимость отдельных субъединиц и их доменов остается слабо изученной. Ранее мы изучили функции отдельных доменов субъединицы SAYP подсемейства PBAP в активации транскрипции [8].

Var170 – другая важная субъединица в подсемействе PBAP, формирующая вместе с SAYP, Polybromo и Brd7-9 модуль привлечения комплекса на специфичные локусы ДНК [9, 10]. В аминокислотной последовательности Var170 выделяют домен, связывающийся с АТ-богатыми мотивами ДНК (ARID); область, богатую мотивами LXXLL; домен RFX и два цинковых пальца типа C₂H₂ [11]. Кроме этого, между доменом RFX и цинковыми пальцами находится внутренне-неупорядоченная область (IDR), согласно предсказательным алгоритмам [ModiDB.org] (рис. 1a).

Ортолог Var170 у млекопитающих – белок ARID2 (BAF200), который входит в состав комплекса PBAF и вовлечен в регуляцию ряда важных процессов, таких как ответ на стресс, мейоз, регуляция комплекса Polycomb, гематопоз и т.д. [12–15]. Детальный молекулярный механизм работы Var170 в комплексе PBAP все еще остается во многом неизвестным. Установление

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Лаборатория регуляции экспрессии генов в развитии, Москва, Россия

²Università di Napoli Federico II, Naples, Italy

³Принстонский университет, Принстон, США

*e-mail: vkchmykhalo@icloud.com

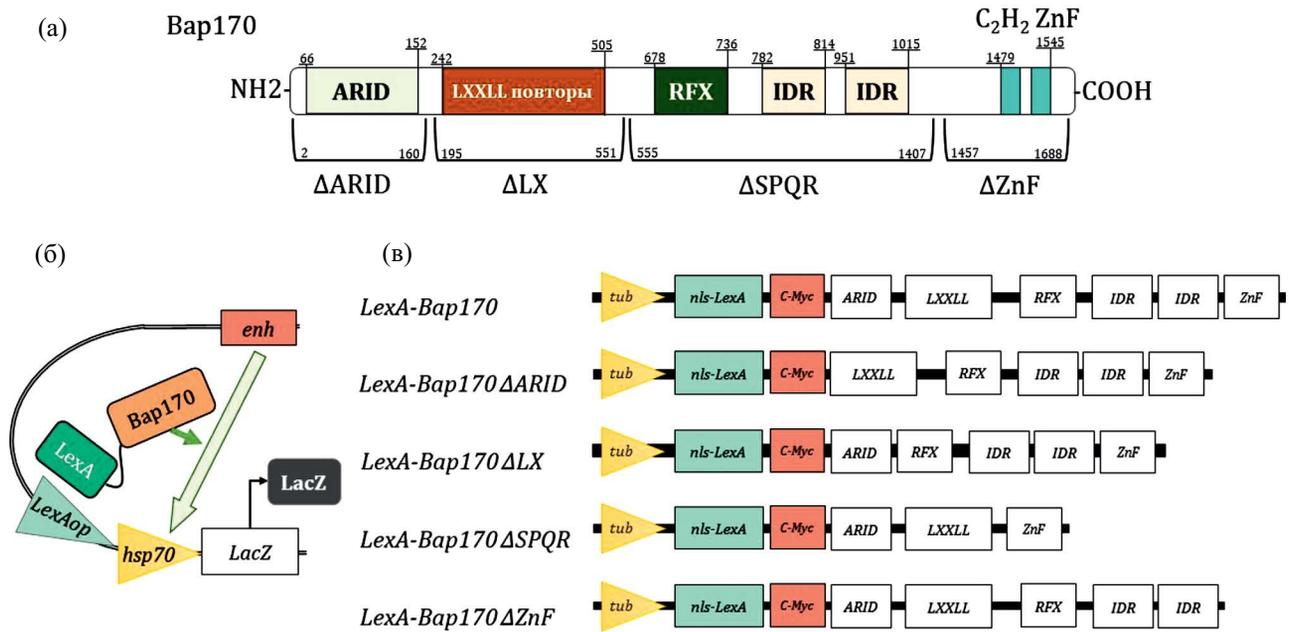


Рис. 1. Структура белка Vap170 и его мутантных форм. а – Доменная структура Vap170. Указаны области, удаленные у проанализированных мутантов. Приведены номера аминокислотных остатков на границе областей. б – Схема используемой модели энхансер-зависимого трансгена *LexAop::LacZ*, экспрессирующегося под контролем слитного белка LexA-Bap170. в – Используемые генетические конструкции и кодируемые ими мутантные формы *Bap170*.

функциональных особенностей доменов и мотивов в структуре таких больших белков, как Vap170, osa, SAYP и Bicra, необходимо для понимания дифференциальных особенностей разных подсемейств комплексов SWI/SNF.

В данной работе мы провели эксперименты, направленные на выяснение роли отдельных доменов Vap170 в энхансер-зависимой регуляции транскрипции. Для начала мы проверили, как ведет себя полноразмерный Vap170 в репортерной системе, созданной нами ранее. В систему входит конструкция, несущая ген β-галактозидазы (*LacZ*) под контролем минимального промотора *hsp70*, слитого с регуляторной последовательностью *LexAop*. Другая конструкция системы содержала кДНК гена *Vap170* с внесенными в 5'-область последовательностями ДНК-связывающего домена белка LexA и эпитопа С-Мус (*LexA-Bap170*) под контролем убиквитарного промотора α-тубулина (*αTub84B*). Обе конструкции встраивали в геном дрозофилы с помощью Р-элемент-опосредованной случайной инсерции. После проведения трансгенеза и серий скрещиваний был получен набор линий мух, несущих обе конструкции, причем репортер *LacZ* был встроен в разных линиях в различные локусы. Мы показали, что репортер *LacZ* в разных линиях мух активировался по паттерну активности энхансера, оказавшегося рядом со встройкой трансгена с репортером.

При этом репортер активировался только в присутствии белка LexA-Vap170 (рис. 1б) [16]. Таким образом, мы показали, что белок Vap170 обладает свойствами активатора энхансер-зависимой транскрипции.

Для выяснения роли отдельных доменов Vap170 в активации трансгена *LacZ* в нашей системе мы получили ряд делеционных мутантов белка. Были созданы конструкции, кодирующие следующие белки: *LexA-Bap170 ΔARID* с делецией домена ARID (2-160 аминокислоты (АК) полипептидной цепи дикого типа); *LexA-Bap170 ΔLX* с делецией мотива LXXLL (195-551 АК); *LexA-Bap170 ΔSPQR* с делецией домена RFX и фланкирующих его мотивов (555-1407 АК); *LexA-Bap170 ΔZnF* с делецией цинковых пальцев (1457-1688 АК) (рис. 1в). Все мутантные формы несли эпитоп С-Мус, их экспрессия была проверена с помощью окрашивания имагинальных дисков антителами к С-Мус. Уровень экспрессии был одинаковым у всех мутантов, только несколько снижен у ΔLX.

Мух, экспрессирующих указанные делеционные варианты *LexA-Bap170*, скрещивали с мухами линий, экспрессирующих трансген *LacZ* под контролем тканеспецифичных энхансеров – *Dad* и *Dpp* (экспрессия в крыловых имагинальных дисках), *Danr* (экспрессия в антеннальных дисках). Затем анализировали у полученных гибридных личинок 3 возраста паттерн активности

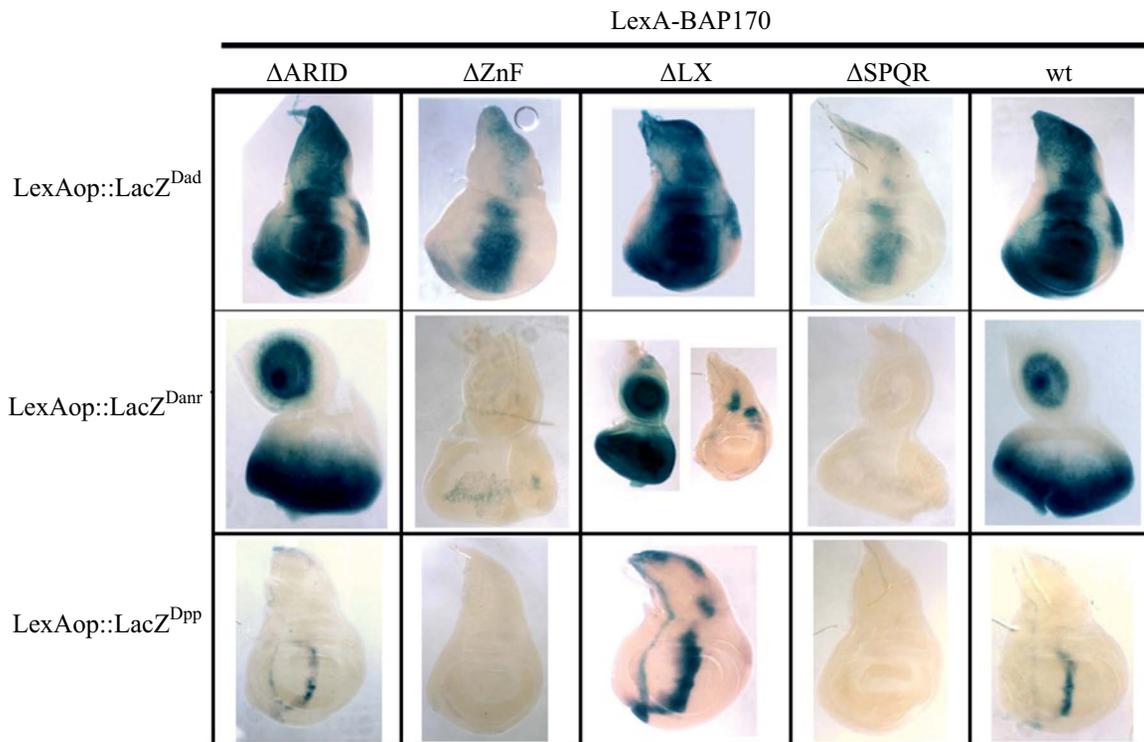


Рис. 2. Активность делеционных вариантов Var170 в энхансер-зависимой экспрессии трансгена LacZ в антеннальных и крыловых имагинальных дисках личинок 3 возраста. Экспозиция при окрашивании одинакова для всех линий. wt – в данном случае LexA-Var170. Слева указано, какой энхансер локализуется рядом со встройкой трансгена lacZ.

бета-галактозидазы в антеннальных и крыловых имагинальных дисках (рис. 2).

Форма с делецией домена ARID сохраняет такой же паттерн активации трансгена LacZ, что и дикий тип. По всей видимости, домен ARID не играет значимой роли в активации транскрипции и его способность связываться с ДНК в данной модели не оказывает значительного эффекта.

Форма LexA-Var170 Δ ZnF демонстрирует сниженную эффективность активации трансгена. Значительно падает активность бета-галактозидазы в LexAop::LacZ^{Dad} линии, однако при этом сохраняется ее тканеспецифичный паттерн. В линиях LexAop::LacZ^{Danr} и LexAop::LacZ^{Dpp} экспрессия репортера не детектируется. Цинковые пальцы Var170 являются, как предполагается, интерфейсом для связывания с субъединицей SAYP [11]. По всей видимости, делеция Δ ZnF приводит к дестабилизации модуля РВАР, ответственного за привлечение на специфические локусы ДНК. Однако белок с данной делецией частично сохраняет активность, что видно на примере репортера LexAop::LacZ^{Dad}.

Форма LexA-Var170 Δ SPQR сохраняет способность к тканеспецифической активации LexAop::LacZ^{Dad}, однако уровень экспрессии

репортера еще ниже, чем в случае LexA-Var170 Δ ZnF. В других трансгенах экспрессия репортера не детектируется. Предположительно, области IDR и RFX важны для обеспечения контакта энхансера и промотора в используемой модели. Примечательно, что мутации в ARID2, ведущие к потере или изменению С-концевой части белка, являются причиной развития 6 типа синдрома Кофина-Сириса [18], что дополнительно указывает на важность регионов SPQR и цинковых пальцев у ортологов Var170.

Делеция Δ LX ведет к повышенной активации трансгена во всех представленных линиях. Например, уровень экспрессии репортера LexAop::LacZ^{Dpp}, индуцированного LexA-Var170 Δ LX, намного выше, чем у дикого типа, однако он сохраняет тканеспецифичность и коррелирует с паттерном экспрессии эндогенного Dpp. Возможно, Var170 за счет мотивов LXXLL способен взаимодействовать с репрессорами транскрипции [17].

Таким образом, мы выяснили роль отдельных доменов Var170 в энхансер-активированной транскрипции. Центральная и С-концевая область белка принципиально важны для данной активности. N-концевая область не участвует в активационной транскрипции в данной модели, а повторы LXXLL оказывают репрессирующее действие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 20-14-00201П.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Поскольку дрозофила является насекомым, специальное разрешение комиссии по биоэтике не требуется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reyes, A.A., R.D. Marcum, and Y. He.* Structure and Function of Chromatin Remodelers // *J Mol Biol.* 2021. 433(14). P. 166929.
2. *Singh, A., et al.* SWI/SNF Chromatin Remodelers: Structural, Functional and Mechanistic Implications // *Cell Biochem Biophys.* 2023. 81(2). P. 167–187.
3. *Hernández-García, J., et al.* Comprehensive identification of SWI/SNF complex subunits underpins deep eukaryotic ancestry and reveals new plant components // *Communications Biology.* 2022. 5(1). P. 549.
4. *Chmykhalo, V.K., et al.* SWI/SNF Complex Connects Signaling and Epigenetic State in Cells of Nervous System // *Mol Neurobiol.* 2024.
5. *Chmykhalo, V.K., et al.* Effects of Overexpression of Specific Subunits SAYP, Bap170 of the Chromatin Remodeling Complex in *Drosophila Melanogaster* // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2024.
6. *Vorobyeva, N.E., et al.* SAYP and Brahma are important for ‘repressive’ and ‘transient’ Pol II pausing // *Nucleic Acids Res.* 2012. 40(15). P. 7319–31.
7. *Moshkin, Y.M., et al.* Remodelers Organize Cellular Chromatin by Counteracting Intrinsic Histone-DNA Sequence Preferences in a Class-Specific Manner // *Molecular and Cellular Biology.* 2012. 32(3). P. 675–688.
8. *Vorobyeva, N.E., et al.* Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(27). P. 11049–54.
9. *Panov, V.V., et al.* Transcription co-activator SAYP mediates the action of STAT activator // *Nucleic Acids Res.* 2012. 40(6). P. 2445–53.
10. *Carrera, I., J. Zavadil, and J.E. Treisman.* Two subunits specific to the PBAP chromatin remodeling complex have distinct and redundant functions during drosophila development // *Mol Cell Biol.* 2008. 28(17). P. 5238–50.
11. *Rendina, R., et al.* Bap170, a subunit of the *Drosophila* PBAP chromatin remodeling complex, negatively regulates the EGFR signaling // *Genetics.* 2010. 186(1). P. 167–81.
12. *Carcamo, S., et al.* Altered BAF occupancy and transcription factor dynamics in PBAF-deficient melanoma // *Cell Reports.* 2022. 39(1). P. 110637.
13. *Soshnikova, N.V., et al.* A novel chromatin-remodeling complex variant, dcPBAF, is involved in maintaining transcription in differentiated neurons // *Front Cell Dev Biol.* 2023. 11. P. 1271598.
14. *Li, M., et al.* Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma // *Nat Genet.* 2011. 43(9). P. 828–9.
15. *Akinjiyan, F.A., et al.* ARID2 mutations may relay a distinct subset of cutaneous melanoma patients with different outcomes // *Sci Rep.* 2024. 14(1). P. 3444.
16. *Shidlovskii, Y.V., et al.* Subunits of the PBAP Chromatin Remodeler Are Capable of Mediating Enhancer-Driven Transcription in *Drosophila* // *Int J Mol Sci.* 2021. 22(6).
17. *Plevin, M.J., M.M. Mills, and M. Ikura.* The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation // *Trends Biochem Sci.* 2005. 30(2). P. 66–9.
18. *Bramswig, N.C., et al.* Heterozygosity for ARID2 loss-of-function mutations in individuals with a Coffin-Siris syndrome-like phenotype // *Hum Genet.* 2017. 136(3). P. 297–305.

**FUNCTIONAL ROLE OF BAP170 DOMAINS
IN ENHANCER-DEPENDENT GENE ACTIVITY
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

**V. K. Chmykhalo^{1, *}, D. Amendola²,
foreign member of RAS P. Schedl³, L.A. Lebedeva¹, Y. V. Shidlovskii¹, E. Giordano²**

¹*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Laboratory of Gene Expression Regulation in Development,
Moscow, Russian Federation*

²*Università di Napoli Federico II, Naples, Italy*

³*Princeton University, Princeton, USA*

**e-mail: vkchmykhalo@icloud.com*

The Bap170 subunit of the SWI/SNF chromatin remodeler exhibits activator functions when artificially recruited to the *LacZ* reporter promoter in enhancer-dependent transcription. In this study, the functional significance of Bap170 protein domains in reporter activation was analyzed. Deletion of the ARID domain does not reduce Bap170 activity. Increased expression of the *LacZ* reporter was observed in the form of Bap170 without a region that includes LXXLL motifs. Deletions of the central (RFX domain and IDRs) and C-terminal region (zinc fingers) lead to a significant decrease in transgene expression. Apparently, these regions of Bap170 are critical for the function of this protein in activated transcription.

Keywords: SWI/SNF complexes, PBAP, Bap170, ARID domain, enhancer, LexA